



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : G01N 33/543, 33/86, 33/68, H01F 1/44	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 97/01760
		(43) Date de publication internationale: 16 janvier 1997 (16.01.97)

(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR96/00964
(22) Date de dépôt international: 20 juin 1996 (20.06.96)

(30) Données relatives à la priorité:
95/07865 29 juin 1995 (29.06.95) FR

(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): UNIVERSITE
PIERRE ET MARIE CURIE (PARIS VI) [FR/FR]; 4, place
Jussieu, F-75252 Paris Cédex 05 (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (US seulement): HALBREICH, Avra-
ham [FR/FR]; 23, rue Louis-Pouey, F-92800 Puteaux (FR).
SABOLOVIC, Domagoj [FR/FR]; 5, rue Durantin, F-
75018 Paris (FR). SESTIER, Claude [FR/FR]; 67, boulevard
Paul-Vaillant-Couturier, F-93100 Montreuil (FR). GELD-
WERTH, Danielle [FR/FR]; 60, boulevard du Montpar-
nasse, F-75014 Paris (FR). PONS, Jean-Noël [FR/FR]; 1,
résidence Brune, Square Auguste-Renoir, F-75014 Paris
(FR). ROGER, Jacky [FR/FR]; 50, rue des Violettes, F-
94440 Villecresnes (FR).

(74) Mandataires: DESAIX, Anne etc.; Ernest Gutmann-Yves
Plasseraud S.A., 3, rue Chauveau-Lagarde, F-75008 Paris
(FR).

(81) Etats désignés: CA, JP, US, brevet européen (AT, BE, CH,
DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT,
SE).

Publiée

Avec rapport de recherche internationale.

(54) Title: MAGNETIC NANOPARTICLES COUPLED TO ANNEXINE, AND UTILIZATION THEREOF

(54) Titre: NANOPARTICULES MAGNETIQUES COUPLEES A DE L'ANNEXINE ET LEUR UTILISATION

(57) Abstract

The invention relates to a process for the production of magnetic particles forming ferrofluids substituted by ADMS (FFSH), said ferrofluids being directly or indirectly couplable by covalent binding to an effector, said process being characterized in that it comprises the following additional steps: a) the FFSS are centrifuged before peptidization, in a basic medium, of the flocculate formed during the addition of ADMS; b) the FFSS are then reduced by addition of dithiothreitol (DTT) at basic pH to form an FFSH mixture; c) the excess of DTT is eliminated by flocculation of FFSH at pH2, the FFSH retained by a magnet being then washed and resuspended in a PBS buffer.

(57) Abrégé

L'invention concerne un procédé pour l'obtention de particules magnétiques formant des ferrofluides substitués par l'ADMS (FFSH), lesdits ferrofluides étant susceptibles d'être couplés directement ou indirectement par liaison covalente à un effecteur, ledit procédé étant caractérisé en ce qu'il comprend les étapes additionnelles suivantes: a) les FFSS sont centrifugés avant peptidisation, en milieu basique, du flocculat formé lors de l'addition d'ADMS; b) les FFSS sont ensuite réduits par addition de dithiothréitol (DTT) à pH basique pour former un mélange FFSH; c) l'excès de DTT est éliminé après floculation du FFSH à pH2, les FFSH retenus par un aimant étant ensuite lavés et resuspendus dans un tampon PBS.

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Arménie	GB	Royaume-Uni	MW	Malawi
AT	Autriche	GE	Géorgie	MX	Mexique
AU	Australie	GN	Guinée	NE	Niger
BB	Barbade	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BE	Belgique	HU	Hongrie	NO	Norvège
BF	Burkina Faso	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BG	Bulgarie	IT	Italie	PL	Pologne
BJ	Bénin	JP	Japon	PT	Portugal
BR	Brésil	KE	Kenya	RO	Roumanie
BY	Bélarus	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CA	Canada	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CF	République centrafricaine	KR	République de Corée	SE	Suède
CG	Congo	KZ	Kazakhstan	SG	Singapour
CH	Suisse	LI	Liechtenstein	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SK	Slovaquie
CM	Cameroon	LR	Libéria	SN	Sénégal
CN	Chine	LT	Lituanie	SZ	Swaziland
CS	Tchécoslovaquie	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CZ	République tchèque	LV	Lettonie	TG	Togo
DE	Allemagne	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DK	Danemark	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
EE	Estonie	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	UG	Ouganda
FI	Finlande	MN	Mongolie	US	Etats-Unis d'Amérique
FR	France	MR	Mauritanie	UZ	Ouzbékistan
GA	Gabon			VN	Viet Nam

NANOPARTICULES MAGNETIQUES COUPLEES A DE L'ANNEXINE ET LEUR UTILISATION.

La présente invention est relative à un nouveau moyen permettant
5 de différencier et/ou séparer des éléments d'un mélange complexe, notamment des cellules, plus particulièrement encore des globules rouges, et présentant à leur surface un récepteur spécifique d'un effecteur couplé à des particules magnétiques. La complexation en surface des particules par l'acide dimercaptosuccinique (ADMS) de formule HOOC-CHSH-CHSH-
10 COOH permet l'obtention d'un ferrofluide stable en milieu aqueux. L'invention porte également sur un perfectionnement du procédé de préparation de ces ferrofluides traités par l'ADMS, rendant ces derniers susceptibles d'être utilisés dans un procédé de différenciation ou de séparation de cellules ou de molécules.

15 Dans ce qui suit, le terme « effecteur », ou « ligand » signifie toute molécule ou macromolécule libre ou liée à une structure qui le contient ou qui le porte, et capable de former un complexe d'affinité avec une autre molécule ou macromolécule, directement ou indirectement.

Dans ce qui suit également, les numéros entre parenthèse renvoient
20 aux références bibliographiques en fin de description.

Les applications biomédicales des solutions colloïdales de particules magnétiques, ou ferrofluides, se sont développées essentiellement dans trois directions :

- l'imagerie (IRM) en tant qu'agents de contraste (1, 2, 3),
- 25 - la séparation magnétique de cellules, organites ou molécules biologiques variées (4, 5, 6, 7, 8, 9)
- la destruction de cellules cibles par création d'une hyperthermie locale sous champ magnétique pulsé (10).

Les particules magnétiques les plus utilisées sont les ferrites
30 MFe_2O_4 (dont la magnétite Fe_3O_4) et la maghémite $\gamma \text{Fe}_2\text{O}_3$. Pour obtenir des solutions colloïdales stables en milieu physiologique, il est nécessaire

dé conditionner la surface des particules. Le plus souvent, les particules sont enrobées de macromolécules telles que des carbohydrates comme le dextran (10, 12, 1), des protéines comme l'albumine (5,8) ou des polymères de synthèse comme les méthacrylates et les organosilanes (7, 9, 13). Cependant, comme l'indique Groman, le recouvrement des particules par des macromolécules de grande masse moléculaire ne permet pas l'obtention de sols stables à long terme. Les macromolécules se séparent des particules qui s'aggrègent alors progressivement. D'autres modes de conditionnement de la surface des particules ont été proposés tels que l'utilisation de molécules de faible masse moléculaire contenant des groupements complexants tels que des phosphates, phosponates et carboxylates (2). Tout particulièrement, les acides polycarboxyliques hydroxylés tels que les acides citriques et tartriques et les acides polycarboxyliques possédant des groupements thiols comme l'acide dimercaptosuccinique (ADMS), se complexent avec les atomes superficiels de fer (III) (14). Chacune de ces molécules complexantes est liée à un ou plusieurs sites superficiels des particules. Les sols aqueux ainsi obtenus sont très stables dans des conditions physiologiques.

Dans beaucoup d'applications biomédicales des particules magnétiques, il est nécessaire de coupler ces dernières à une protéine spécifique. Ainsi, dans le cas du tri cellulaire sous champ magnétique, les particules doivent pouvoir se lier spécifiquement aux cellules cibles. Cette reconnaissance est souvent assurée par la formation d'un complexe antigène-anticorps entre un antigène de surface de la cellule cible et un anticorps lié aux particules. La protéine peut être soit adsorbée directement à la surface des particules (4) soit liée par covalence (5,7, 13). L'utilisation de composés intermédiaires bifonctionnels tels que le N-Succinimidyl 3-(2-pyridyldithio)-propionate (SPDP) (8, 14) permet de lier fortement un anticorps à une particule par une liaison peptidique et un pont disulfure, sans altération de la protéine ni de ses propriétés antigéniques (15).

Le brevet français n° 2 662 539 (14) décrivait un procédé d'obtention de supports magnétiques finement divisés par modification contrôlée de particules chargées de ferrofluide précurseur, comprenant une étape de traitement avec un agent capable de modifier la nature de la surface desdites particules, et de manière à les rendre stables dans des solvants polaires ou non polaires, dans des gammes de pH étendues et à leur conférer une réactivité chimique ou biologique. Un exemple d'une telle modification est un ferrofluide à base d'ADMS permettant de rendre disponibles et réactifs à la surface de ces dits ferrofluides substitués des groupes thiols ; cependant dans les conditions de pH et de force ionique habituelles, ces groupes thiols ont tendance à s'oxyder et à former des ponts disulfures rendant ces ferrofluides mal adaptés à une utilisation comme constituants d'un effecteur magnétique.

Une utilisation, notamment pour différencier et/ou séparer des cellules présentant à leur surface un récepteur d'un ligand signal d'une propriété ou d'un état physiologique particulier, rendait nécessaire le perfectionnement des ferrofluides du brevet 2 662 539 (14) de telle façon que des ponts disulfure ne limitent pas le couplage ; Un tel perfectionnement permettant alors de produire des complexes ferrofluides ADMS couplés de façon covalente aux dits effecteurs puis de les utiliser comme moyen de différenciation et de séparation des complexes ou cellules portant le cas échéant le récepteur dudit effecteur.

Les couples d'affinités effecteurs/récepteurs sont multiples et l'invention telle que décrite ci-dessous pourra être par l'homme du métier aisément appliquée aux couples de récepteurs qui l'intéresseront, mais également aux autres paires d'affinité tels les couples anticorps/antigènes, lectines/polysaccharides, biotine/avidine, acides nucléiques (brins + et -), etc...à partir du moment où l'effecteur peut être couplé aux particules par l'intermédiaire d'un réactif bifonctionnel comportant ou non des résidus thiols dont l'une des fonctions permet la liaison à l'effecteur et dont l'autre

fonction est capable de former des liaisons S-S, C-S, C-C ou C-N avec l'ADMS.

Une application particulière de l'utilisation du ferrofluide couplé à un effecteur est l'utilisation comme effecteur d'une annexine, comme l'annexine V, qui présente une affinité particulière, en présence d'ions calcium, pour les phospholipides anioniques, comme la phosphatidylserine (PS) et dans, une moindre mesure, la phosphatidylethanolamine (PE). Ces composés des membranes plasmiques sont essentiellement localisés dans le feuillet interne des membranes contrairement à d'autres composés type phosphatidyl choline et sphingomyéline qui sont au contraire majoritairement localisés dans le feuillet externe des membranes plasmiques. Les membranes cellulaires présentent une asymétrie telle que quand la membrane est saine, les phosphatidyl sérines et une partie des phosphatidylethanolamines résidant sur le feuillet interne sont inaccessibles alors que quand les membranes sont perturbées, il y a une localisation aléatoire de ces mêmes phospholipides. Par voie de conséquence ceux qui sont localisés dans le feuillet interne des membranes deviennent accessibles sur les cellules entières et en particulier la phosphatidyl sérine devient accessible à un couplage par une annexine comme l'annexine V ou attaquable par une phospholipase extérieure. Cette perturbation peut être due à une inflammation, à une apoptose (16), à des réactions autoimmunes (17), à une anémie falciforme (18, 19) , ou à un état pathologique ou infectieux de l'individu (19, 22), ou simplement à un vieillissement excessif des cellules et notamment des cellules sanguines pendant leur conservation in vitro (23). On croit que la présence de phosphatidylsérine dans le feuillet externe de la membrane plasmique constitue un signal pour l'élimination de la cellule par le système immunitaire (24, 25).

La demande de brevet WO 91/09628 est relative à l'utilisation de polypeptides anticoagulants de la famille des annexines munis d'un marqueur et ces annexines ou VAC (vascular anticoagulant protein)

marquées sont utilisées comme moyen de différencier les phosphatidyl sérines des phosphatidyl cholines et de diagnostiquer ainsi un état préthrombotique par la présence d'un couplage de l'annexine aux cellules présentant un phosphatidyl sérine de manière accessible.

5 Les annexines sont un groupe de protéines homologues, de 35 à 45 k daltons, qui sont trouvées dans tous les mammifères à différents stades de développement ainsi que dans d'autres vertébrés tels les arthropodes, les slime moulds (26), les levures, les éponges, les champignons, protozoaires, plantes et bactéries (27, 28). Toutes les cellules de
10 mammifères, hormis les érythrocytes, produisent un annexine comme l'annexine V. La structure des annexines et leurs propriétés sont décrites dans des revues (28, 29). Ces protéines ont été séquencées et certaines d'entre elles sont disponibles comme protéines recombinantes (27). Comme exposé plus haut, les membranes cellulaires qui ont été
15 endommagées par un quelconque mécanisme présentent une capacité accrue à lier les annexines ; cela peut être observé par exemple en comparant des érythrocytes frais aux érythrocytes qui ont subi un temps de stockage relativement long. Dans la mesure où cette augmentation de capacité de liaison à l'annexine est le reflet d'une anomalie, la mesure de
20 la capacité de couplage à l'annexine par les érythrocytes s'avère être un outil important pour le contrôle de qualité du sang à utiliser dans les transfusions sanguines.

La sélection du sang pour la transfusion est faite essentiellement par trois critères : la compatibilité immunologique du donneur et du
25 receveur, l'absence de contamination virale ou parasitaire et l'absence de pathologie chez le donneur. Des tests adéquats ont été développés pour vérifier les groupes sanguins et les contaminations virales ou parasitaires éventuelles ; l'état sanitaire du donneur est évalué par simple interrogatoire. Il est intéressant cependant de noter que rien n'existe pour
30 contrôler la dégradation du sang pendant sa conservation sachant que des sangs individuels peuvent vieillir à des vitesses différentes. Un autre

problème potentiel qui peut se poser dans la sélection du sang transfusionnel est celui de son contrôle quand nombre de virus ou d'agents pathogènes sont encore inconnus et donc indétectables.

Un moyen, tel que proposé dans la présente invention, qui a l'avantage d'être simple d'utilisation, permet de discriminer les cellules susceptibles de se coupler aux annexines, en particulier à l'annexine V, en présence de calcium et présentant un état membranaire perturbé, des cellules normales du mélange et d'en déterminer leur importance.

La présente invention est un procédé perfectionné pour l'obtention de particules magnétiques complexées par l'ADMS, formant des ferrofluides appelés FFSH, lesdits ferrofluides étant susceptibles d'être couplés directement ou indirectement par liaisons covalentes à un effecteur permettant de former des complexes covalents FFSH-effecteurs, ledit procédé comprenant les étapes additionnelles suivantes par rapport au procédé décrit dans le brevet français 2 662 539 :

- a) les FFSS, qui sont constitués de particules associées aux produits d'oxydation de l'ADMS, sont centrifugés avant peptidisation du floculat formé lors de l'addition du ligand,
- b) les FFSS sont ensuite réduits par addition de dithiothréitol (DTT), qui coupe les ponts disulfure et régénère l'ADMS, à pH basique, pour former FFSH ,
- c) l'excès de DTT est éliminé par floculation des FFSH à pH 2, les FFSH retenus sur un aimant étant ensuite lavés et resuspendus dans un tampon neutre, par exemple un tampon PBS.

L'invention porte également sur le procédé pour l'obtention des particules magnétiques substituées à l'ADMS (FFD) couplées de façon covalente à un effecteur et qui comprend les étapes suivantes :

- a) Obtention d'effecteurs présentant des groupements thiols accessibles : Pour que l'effecteur puisse former des liaisons covalentes avec les groupements thiols des FFSS ou des FFSH, il doit lui-même comporter des groupements thiols. Soit la macromolécule elle-même comporte ces dits

résidus, soit ils sont générés de façon covalente par couplage à un réactif bifonctionnel, lequel réactif doit lui-même posséder ces résidus aptes à réagir avec les groupements SH de l'ADMS et une deuxième fonction réactive apte à former des liaisons covalentes avec l'effecteur lui-même.

5 Un réactif bifonctionnel qui pourrait être utilisé dans ce cadre est SPDP, qui outre une liaison avec un groupement thiol est capable de former une liaison avec des amines primaires ; mais on peut citer également le N-Succinimidyl S-Acéthylthioacétate (SATA), le succinimidyl bromo acétate ou le carboxydiimide, les maléimides, et les dérivés chlorés des alkyl ou aryl
10 sulfonyl (tresyl, tosyl, etc...). Le réactif bifonctionnel, par exemple le SPDP est ajouté à l'effecteur dans un solvant anhydre (par exemple le 1-méthyl 2-pyrrolidone) et incubé pendant 2 heures à température ambiante. L'excès de SPDP est éliminé par filtration sur gel ou par dialyse.

b) Couplage de l'effecteur à FFSH :

15 L'effecteur présentant des groupements pouvant agir avec des thiols soit directement soit indirectement par couplage avec le réactif bifonctionnel dans les conditions décrites ci-dessus est incubé en présence de ferrofluides traités par l'ADMS et réduit par le DTT (FFSH) selon le procédé décrit plus haut, formant ainsi un complexe covalent effecteur-
20 FFSH ; par complexe covalent on entend que la covalence réside dans la liaison au niveau des groupes thiols, par formation de ponts S-S entre les résidus SH de l'ADMS et les résidus SH ou ester sulfonique de l'effecteur natif ou substitué par le réactif bifonctionnel ; il peut arriver que des groupements thiols ou autres des FFSH n'aient pas réagi dans les étapes
25 précédentes, et le cas échéant ces groupements sont masqués par un traitement à saturation par de la sérum albumine qui les rend, après formation du complexe effecteur-FFSH (ou ceux liant l'effecteur aux particules à travers un autre agent bifonctionnel) inaptes à réagir avec un autre réactif.

30 Les complexes covalents obtenus effecteurs-FFSH (ou ceux liant l'effecteur aux particules à travers un autre agent bifonctionnel) sont ainsi

capables de former des complexes d'affinités avec des récepteurs ou des moitiés de paires d'affinités susceptibles de se coupler à l'effecteur, et la propriété magnétique de ces complexes peut être utilisée pour discriminer, mesurer et/ou séparer les effecteurs-FFSH ayant réagi, de ceux n'ayant pas réagi.

Une telle séparation est particulièrement intéressante lorsque l'on souhaite séparer des catégories de cellules qui diffèrent par la nature d'un récepteur à la surface de ces dernières ; en effet les méthodes de séparation existantes sont souvent traumatisantes pour les cellules et les séparations que l'on peut appliquer aux macromolécules, notamment les chromatographies d'affinités, sont peu pratiques pour les séparations de cellules. L'homme du métier sait dans quel cas il est particulièrement intéressant de séparer une catégorie particulière de cellules dans un mélange complexe ; on peut citer à titre d'exemples les plus illustratifs les cellules souches de la moelle osseuse pour traiter ex vivo et les réinjecter à des patients pour les traiter par thérapie génique, ou encore certaines catégories de lymphocytes, récolter les plaquettes n'ayant pas été activées, et de façon plus générale toutes cellules que l'on souhaite séparer ou éliminer par exemple suite à une infection virale pour réinjecter ensuite le « pool » cellulaire de manière homologue ou autologue à des individus.

Dans cet esprit, il existe une catégorie de cellules qu'il est extrêmement difficile de discriminer : ce sont les érythrocytes ou globules rouges qui proviennent d'individus malades ou infectés ou encore qui se sont dégradés suite à un temps de conservation in vitro trop important. Le contrôle de qualité des globules rouges, ou des concentrés globulaires reste aujourd'hui un problème majeur de la thérapeutique transfusionnelle, un doute subsistant toujours quant à la qualité sanitaire des globules rouges qui sont injectés aux patients dans la mesure où une infection trop récente n'est pas détectable par les moyens de diagnostics classiques, que l'on est incapable de détecter des infections par des pathogènes

inconnus, et que l'on ne peut se permettre de prolonger le stockage des poches de sang sous peine de détériorer un certain nombre de cellules sanguines.

Il a été dit plus haut que les membranes cellulaires et notamment
5 les membranes cellulaires des globules rouges sont endommagées ou perturbées suite à différentes pathologies ou à leur vieillissement, voire l'interruption de la chaîne du froid, une telle perturbation conférant aux cellules une capacité de liaison aux annexines.

L'invention porte également sur un procédé pour l'obtention des
10 particules magnétiques formant des ferrofluides, complexés par l'ADMS de façon à pouvoir être couplés à une annexine. Des groupements thiols peuvent être générés par couplage covalent des annexines au SPDP. Dans le procédé de l'invention et pour former des complexes FFSH-annexines, appelés AnxFF, le rapport entre les FFDTT et l'annexine-SPDP
15 est compris entre 30 et 120 μ g et de préférence entre 30 et 60 μ g pour 1 ml de FFSH.

L'invention porte également sur des particules de ferrofluides complexées par l'ADMS et traitées par le DTT par un procédé tel que décrit plus haut, ainsi que sur des particules de ferrofluides couplées de
20 façon covalente par l'intermédiaire de ponts disulfures entre l'ADMS et les effecteurs, lesquels complexes sont obtenus par le procédé décrit ci-dessus. Un mode de réalisation préféré de ces complexes sont des particules de ferrofluides couplées à une annexine.

Dans ce qui précède et ce qui suit, nous parlerons indifféremment
25 de particules effecteur-FF, effecteur-FFSH, de complexes FF ou FFD-effecteur et quand l'effecteur est une annexine ou un peptide actif dérivé de l'annexine comme par exemple le peptide N-acétyl-lipocortine i dérivé de l'annexine I (30), d'AnxFF; et dans tous les cas ils sont complexés par l'ADMS puis traités par le DTT selon le perfectionnement de l'invention et
30 couplés par un agent bifonctionnel.

La présente invention porte également sur l'utilisation des complexes effecteurs-FFSH obtenus par le procédé décrit ci-dessus, à la différenciation et/ou à la séparation des composés portant un récepteur du dit effecteur de ceux ne portant pas ledit récepteur. Le récepteur ici est
5 entendu comme une molécule ou une macromolécule pouvant former un complexe d'affinité avec l'effecteur, que cette molécule ou macromolécule soit libre dans un milieu ou intégrée dans une structure complexe par exemple une membrane.

Dans une utilisation préférée selon l'invention, le ligand est une
10 annexine, et le récepteur du ligand est la phosphatidyl sérine (PS) ou la phosphatidyléthanolamine (PE), phospholipides susceptibles, en présence de Ca^{2+} , de se lier au complexe Anx FF après perturbation des structures membranaires ; dans ce cas l'utilisation selon l'invention permet de différencier et/ou de séparer les cellules présentant un état anormal - et
15 donc capable de se lier au Anx FF en présence d'ions calcium- des cellules saines incapables de lier ces particules.

Dans l'utilisation de l'invention, les particules des Anx FF ont une taille comprise entre 3 et 30 nm et de préférence entre 5 et 15 nm.

Comme il a été dit plus haut, le contrôle des érythrocytes avant une
20 transfusion sanguine ou une injection d'un culot globulaire continue de poser un problème de sécurité sanitaire desdites cellules. Une utilisation des particules selon l'invention permet de pallier la carence qui existait jusqu'alors : sur un sang total ou sur un concentré globulaire, il est possible aujourd'hui d'envisager de détecter la présence d'érythrocytes
25 présentant un état physiologique anormal dû à un vieillissement excessif ou étant le reflet d'un état pathologique de l'homme et, selon ce que l'on souhaite, séparer ces cellules anormales des cellules saines ou simplement contrôler un prélèvement avant une éventuelle transfusion ; les particules de l'invention peuvent enfin être utilisées dans un processus
30 d'identification d'un éventuel état pathologique, comme étape préliminaire avant une identification plus poussée par d'autres moyens connus de

l'homme du métier ; il peut s'agir par exemple de la présence d'une réaction inflammatoire, de réactions auto-immunes ou d'une perturbation dans la cascade de la coagulation. Les complexes annexines-ferrofluides (Anx FF) peuvent également être utilisés pour un contrôle de qualité des lymphocytes et des plaquettes avant une utilisation de ces cellules à des fins thérapeutiques par exemple.

Des observations récentes (22) ont montré que l'oxyde nitrique synthétase est inhibée par les phosphatidyl sérines sécrétées ou exposées à la surface des cellules ; dans ce contexte, les particules Anx FF de l'invention peuvent être utilisées à la fabrication d'un médicament destiné à traiter les déficiences immunitaires induites par les virus ou les parasites.

L'invention porte également sur une méthode pour différencier et/ou séparer des cellules présentant un état physiologique ou pathologique anormal et se manifestant par la présence d'un récepteur à l'annexine, notamment la phosphatidyl sérine, à leur surface, ladite méthode comprenant :

- a) un couplage des particules Anx FF obtenu par un procédé décrit ci-dessus et explicité dans les exemples ci-après, aux cellules en présence d'ions calcium ;
- b) la séparation des cellules couplées aux Anx FF des cellules non couplées par l'utilisation d'un champ magnétique,
- c) le comptage ou l'évaluation des cellules s'étant couplées aux Anx FF,
- d) l'évaluation de la proportion des cellules saines étant réalisée par la mesure du rapport entre les cellules n'ayant pas réagi avec les Anx FF au nombre total de cellules.

Cette méthode de l'invention est appliquée de façon préférée aux érythrocytes ; dans cette méthode, les ions calcium sont apportés par le CaCl_2 à une concentration comprise entre 0,5 et 5 mM.

Le coeur de ce dispositif de différenciation et/ou de séparation est la propriété magnétique des particules Anx FF ; l'invention porte également sur un dispositif permettant cette différenciation et/ou cette séparation qui

utiliserait cette propriété ; le dispositif selon l'invention comprend au moins :

- a) un électroaimant,
- b) une pompe,
- 5 c) un moyen d'amener l'échantillon,
- d) un moyen d'amener le tampon contenant les ions Ca^{++} ,
- e) un moyen d'amener le tampon de lavage,
- f) des valves permettant de contrôler les passages des différents fluides cités en c), d) et e).

10 Les exemples ci-dessous ainsi que les différentes figures illustrent l'invention sans pour autant lui conférer aucun caractère limitatif.

Légende des figures

Figure 1 : dispositif automatique de triage des globules rouges ou une autre cible retenue par Anx FF.

15 Figure 2 : influence des cations Ca^{2+} sur le couplage de l'Anx FF avec les érythrocytes.

Figure 3 : Evolution du couplage des érythrocytes avec Anx FF au cours du stockage in vitro.

20 Figure 4 : Taux de rétention des érythrocytes par Anx FF en fonction du nombre de cellules utilisées dans le test.

Figure 5 : Taux de rétention des érythrocytes en fonction de la quantité d'Anx FF utilisée dans le test.

Exemple 1 : préparation des ferrofluides ADMS (FFSH)

25 Le ferrofluide de départ est un ferrofluide nitrique synthétisé selon la méthode du brevet Français 2 662 539. Il est constitué de nanoparticules de maghémite $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ d'un diamètre compris entre 3 et 30 nm (diamètre moyen : 9nm) chargées positivement en surface en milieu acide ($\text{pH} < 6$) ou négativement en milieu basique ($\text{pH} > 10$).

30 L'obtention d'un sol stable vers pH 7-8 pour réaliser un couplage en phase liquide homogène dans des conditions non dénaturantes pour les protéines (ici l'annexine) ou autres molécules biologiques se fait par

complexation des fer de surface par l'ADMS. Les groupements thiols libres permettent la formation de liaison S-S avec le SPDP préalablement fixé à la protéine par liaison peptidique.

1ère étape : 5cm³ de ferrofluide nitrique ([Fe] = 1 mol.l⁻¹) sont ajoutés à 250
5 cm³ d'une solution d'ADMS 10⁻³ mol.l⁻¹ dans l'eau distillée dégazée. Le rapport [ADMS] / [Fe] est de 0,05. Il y a floculation et après 30 minutes le pH est voisin de 4,5.

2ème étape : l'excès d'ADMS est éliminé par centrifugation : 10 minutes à 3000 t/mn.

10 3ème étape : le floculat est peptisé par une solution de soude 0,1 mol.l⁻¹ jusqu'à pH 11. Il se forme un sol stable entre pH 3 et 11. Le volume est ajusté à 50 cm³ et le pH à 7 par une solution diluée de HCl. Ce ferrofluide-ADMS ([Fe] = 10⁻¹ mol.l⁻¹) est stable dans le temps et sert de solution mère pour ses applications ultérieures.

15 4ème étape : Avant couplage à la protéine-SPDP, 1 cm³ du ferrofluide précédent est additionné de 1cm³ d'une solution aqueuse de DTT à 10⁻² mol.l⁻¹ vers pH9. On laisse incubé 1 heure, puis le mélange est floculé par addition de HCl 0, 1 mol.l⁻¹ jusqu'à pH=2. Après centrifugation 10 minutes à 5000 t/mn le floculat est peptisé par une solution de PBS (0,1 mol.l⁻¹) et
20 le pH est ajusté à 7,4. Cette séquence précipitation-peptisation est recommencée deux fois pour éliminer totalement l'excès de DTT et l'ADMS éventuellement libéré lors de la coupure des ponts disulfure. Lors de la dernière peptisation le volume de PBS est adapté à la concentration désirée pour le ferrofluide avant son couplage par incubation directe avec
25 la protéine-SPDP.

Exemple 2 : préparation du complexe ferrofluide-annexine

1) Le ferrofluide est traité à l'acide dimercaptosuccinique (ADMS) et réduit par le dithiothréitol à pH 9.2 et à température ordinaire (FFSH). Après floculation de FFSH à pH2 et centrifugation, le surnageant, contenant
30 l'excès de DTT est éliminé, le floculat retenu par un aimant est lavé puis dispersé dans un tampon phosphate (PBS). Les groupements thiol du

FFSH sont dosés par le réactif d'Ellman (acide 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoïque) (31), avec des modifications mineures pour éliminer l'interférence des particules de ferrofluides dans la lecture au spectrophotomètre.

- 5 2) On fait réagir une annexine, ici l'annexine recombinante V, avec du SPDP en milieu PBS, le SPDP étant en excès par rapport à l'annexine (2,5 moles de SPDP par mole d'annexine). Le SPDP est dissous dans un solvant anhydre, 1-méthyl-2-pyrrolidone, puis ajouté à l'annexine en milieu aqueux; On laisse le mélange incuber à la température ambiante.
- 10 L'annexine-SPDP est obtenue, et le SPDP en excès est hydrolysé spontanément.

- 3) Différentes quantités d'annexine SPDP sont incubées avec les FFSH pendant 2 heures à température ambiante, le rapport optimal entre les deux composants étant déterminé expérimentalement par exemple par la
- 15 mesure du changement de la mobilité électrophorétique des particules en solution en utilisant l'effet Doppler. Dans ce cas la mobilité électrophorétique du complexe Anx FF est comparée à celle des FFSH ; une autre méthode est la détermination de l'activité enzymatique ou d'une autre propriété fonctionnelle de l'effecteur, telle que son affinité pour un
- 20 anticorps, ou la capacité de former un complexe d'affinité avec des anticorps d'un complexe peroxydase/protéine A immobilisé sur les particules, et la détermination de l'activité peroxydase. Une activité optimale est obtenue par la fixation de 1,5 à 2 µg d'annexine sur 1 ml de FFSH comme l'a montré l'utilisation des méthodes précitées.

- 25 4) L'ADMS qui n'a pas réagi avec l'effecteur ainsi que d'autres sites potentiellement réactifs sur les particules de ferrofluides sont masqués par saturation avec 1% de BSA (pour bovine serum albumine) dans 50 mM de tampon NaHCO_3 et pH 9.6 pour donner les Anx FF. Dans certains cas d'autres protéines telle la sérum albumine humaine peuvent être plus
- 30 appropriées. Une attention particulière est apportée afin d'éviter une floculation résultant d'un excès de saturation.

Exemple 3 : couplage des Anx FF aux cellules

Un mode de réalisation du couplage de Anx FF aux érythrocytes est de mélanger :

- 30µl d'une suspension d'érythrocytes à 30%,
5 - 30µl d'Anx FF,
- 6 µl de CaCl₂ à 125 mM,
- 7,5 µl de BSA à 4%,
- 256 µl de tampon.

Le mélange réactionnel est incubé pendant 30mn à 37C° puis dilué avec
10 6ml de tampon TRIS additionné de BSA à 0,1% et de 5mM de DTT.

Exemple 4 : Séparation des cellules retenues par Anx FF des cellules non retenues

Cette séparation est réalisée par un appareil automatique dont un exemple
donné dans la figure 1 est le suivant : un tube en tygon est placé dans un
15 champ magnétique et connecté à différents réservoirs via des
électrovannes. Le champ électromagnétique est activé et le mélange
réactionnel décrit dans l'exemple 3 ci-dessus est, après une incubation à
37°C, introduit dans le tube par l'activation de la vanne appropriée et
traverse le champ magnétique avec un débit de 120 ml par heure, et
20 l'effluent est collecté.

Une vanne contrôlant un réservoir de lavage est activée et 15 ml de
tampon traversent le tube. Le tampon de lavage est récolté au même
niveau que l'effluent constitué de cellules non retenues par les Anx FF.

Les cellules retenues par les Anx FF sont éluées du tube en
25 coupant le champ magnétique et en récoltant les cellules retenues dans 8
ml de tampon. Les cellules retenues et non retenues sont concentrées par
une centrifugation à 3000 g pendant 7 mn et à 4°C puis comptées avant
tout traitement ultérieur éventuel ou caractérisation. Une quantification des
récepteurs à l'annexine dans une population cellulaire peut être faite en
30 utilisant de l'annexine marquée à l'iode 125.

Si on se réfère à la figure 1, lors de la première étape de lavage avec l'eau physiologique les vannes 1 et 4 sont ouvertes, et les vannes 2, 3, 5 et 6 sont fermées ; la pompe est à son maximum pendant 2 à 10 minutes puis arrêtée.

- 5 Le tampon est ensuite introduit par le même tube (vannes 2 et 4 ouvertes). L'échantillon du culot est introduit avec un débit de 160 ml/heure, les vannes 3 et 5 étant ouvertes (1, 2, 4, 6 fermées). La pompe fonctionne entre 3 et 60 secondes puis arrêtée.

- La fraction non retenue en présence de tampon CaCl_2 est ensuite collectée
10 en faisant passer le tampon à un débit de 160 ml par heure, les vannes 2 et 5 étant ouvertes (1, 3, 4, 6 fermées). La pompe est actionnée pendant 2 à 10 minutes puis fermée.

- La fraction retenue est obtenue après lavage avec l'eau physiologique, les vannes 1 et 6 étant ouvertes (2, 3, 4, 5 fermées), l'électroaimant étant
15 éteint et la pompe actionnée pendant 2 à 10 minutes.

Un dernier lavage avec de l'eau physiologique est effectué en ouvrant les vannes 1 et 4 (2, 3, 5, 6 fermées) pendant 2 à 10 minutes.

Résultats comparatifs

a) Effets de ions calcium.

- 20 La figure 2 représente le pourcentage de cellules retenues sur les particules Anx FF en fonction de la présence ou de l'absence de CaCl_2 . On voit que 44% des cellules sont retenues en présence d'ions calcium alors que 8% seulement sont retenues en absence d'ions calcium.

b) Effet de l'âge des érythrocytes.

- 25 La figure 3 représente le pourcentage d'érythrocytes liés aux Anx FF en fonction du temps de conservation in vitro des globules rouges. Il est clair que ce pourcentage augmente de façon logarithmique en fonction du temps de stockage indiquant une détérioration croissante des membranes desdits globules rouges. Une semaine de stockage conduit à 22% de
30 couplage, un mois à 30% et trois mois à 42%.

Chez la souris un stockage de 24 heures entraîne déjà un couplage de 13% alors que aucune liaison n'est observée avec du sang fraîchement collecté.

5 c) Effet de la concentration en érythrocytes sur la séparation des complexes érythrocytes - Anx FF.

Cet effet est représenté sur la figure 4, qui montre que le résultat obtenu est indépendant de la concentration en globules rouges dans la solution : dans les conditions utilisées, entre 20 et 24% des cellules sont retenues quelle que soit la concentration utilisée.

10 d) Effet des différentes doses de FFSH-annexine sur la rétention des érythrocytes.

La figure 5 représente le pourcentage de globules rouges retenu sur les Anx FF en présence de 20 µl ou 30 µl de FFSH-annexine. On voit que 20 µl d'Anx FF sont suffisants pour obtenir une rétention maximale à partir
15 d'une population érythrocytaire jeune, tandis que 30µl sont nécessaires pour des érythrocytes agés.

f) Relation entre le couplage Anx FF des érythrocytes et l'état physiologique ou pathologique de ces même globules rouges.

Le tableau ci-dessous indique les résultats obtenus individuellement sur
20 des prélèvements contrôles effectués par l'Agence Française du Sang.

Contrôle AFS	VS normale	Anémie falciforme	VS élevée	Autres Pathologies
19,60	21,73	50,00	36,94	49,76
0,00	16,75	49,00	36,37	63,00
14,80	19,56	64,00	51,26	63,00
12,00	27,59	35,00	54,49	
11,90	32,00	49,00	49,85	
18,00		53,20	46,80	
0,00			65,70	
12,60			71,00	
14,00				
5,90				
12,00				
10,00				
8,70				
(*) 10,7 ± 5,9	23.5 ± 6.2	50 ± 9.3	51.5 ± 12.3	58.6 ± 7.6

(*) Moyenne

La moyenne de rétention des globules rouges aux Anx FFest de 10,7 plus ou moins 5.9. Les résultats portés dans les quatre dernières colonnes concernent des prélèvements sanguins de sujets s'étant présenté dans des laboratoires d'analyse médicale. Les échantillons nous ont été attribués en préservant l'anonymat des sujets. Seule la vitesse de sédimentation (VS) nous était connue. Les résultats portés dans la deuxième colonne montrent un taux de rétention moyennement élevée chez des sujets à VS normale dont la pathologie nous est restée inconnue. Les résultats portés dans la cinquième colonne concernent des sujets à VS également normale, mais présentant un taux de rétention nettement plus élevé, pour lesquels la pathologie a pu être identifiée après enquête : un cas de carcinome (le sujet étant sous chimiothérapie), un cas de rhumatisme déformant et un cas de début de rhinopharyngite. Les résultats portés dans les troisième et quatrième colonnes concernent des échantillons sanguins à VS élevée de sujets présentant une pathologie connue (troisième colonne) ou inconnue (quatrième colonne). Ces

résultats indiquent bien qu'un pourcentage de rétention anormalement élevé au Anx FF est le reflet d'un état physiologique ou pathologique qui doit conduire le transfuseur à rejeter le lot de globules rouges à des fins transfusionnelles.

REFERENCES

- (1) J.M. Lewis, E.T. Menz, F.E. Kenny, E.V. Groman, L. Josephson, US Patent 5,055,288 (1991)
- 5 (2) H. Pilgrimm, US Patent, 5,160,725, (1992)
- (3) E.V. Groman, L. Josephson, US Patent, 5,248, 492, (1993)
- (4) Giaever, US Patent, 4,115,535, (1978)
- (5) K.J. Widder, EU Patent, 0,016,552 A1, (1980)
- (6) R.S. Molday, US Patent, 4,452,773, (1984)
- 10 (7) R.A. Whitehead, M.S. Chagnon, E.V. Groman, L. Josephson, US Patent 4, 695, 392 (1987)
- (8) C.S. Owen, J.C. Silvia, L. D'Angelo, P.A. Lierti, US Patent, 4,795, 698 (1989)
- (9) C.H. Wang, D.O. Shah, Int Patent, WO 91/09141, (1991)
- 15 (10) R.T. Gordon, US Patent, 4,735,796, (1988)
- (11) M. Hasegawa, S. Hokkoku, US Patent, 4,101,435, (1978)
- (12) U. Schröder, K. Mosbachhhh, US Patent, 4,501,726, (1985)
- (13) M. Okada, Y. Ashihara, A. Yano, M. Oishi, K. Yoshioka, T. Nakamura, Eur. Patent, 0 420 186 A2, (1990)
- 20 (14) R.Massart, V. Cabuil-Marchal, J.M. Fruchart, J. Roger, J.N. Pons, M. Carpentier, S. Neveu, R. Brossel, T. Bouchami, A. Bee-Debras, Fr Patent, 90 06 484 (1990)
- (15) J. Carlsson et al., Biochem J., 173,723, (1978)
- (16) V.A. Fadok, D.R. Voelker, P.A. Campbell, JJ. Cohen, D.L. Bratton, P.M. Henson, J. Immunol., 148,2207, (1992)
- 25 (17) J. Matsuda, N. Saitoh, K. Gohchi, M. Gotoh, M. Tsukamoto, Amer. J. Hematol, 47,56? (1994)
- (18) B. Lubin, D. Chiu, J. Bastacky, B. Roelofsen, L.L.M. Van Deenen, J. Clin, Invest, 67,1643 (1981)
- 30 (19) J.F. Wright, A. Kurosky, S. Wasiiii, Biochem, Biophys. Res Comm., 198,983, (1994)

- (20) M. Otto, A. Günther, H. Fan, O. Rick, R.T.C. Huang, FEBS lett, 356,125 (1994)
- (21) AR Neurath, N Strick, Virol., 204,475 (1994)
- (22) H. Cesar Calderon, Z.H. Huang, D.A. Ggae, E.M. Sotomatoyor, D.M. Lopez, J. Exp. Med., 180,945, (1994)
- (23) J.F. Tait, D. Gibson, J. Lab, Clin. Med., 123,741, (1994)
- (24) A.J. Schroit, J.W. Masden, Y. Tanaka, J. Biol. Chem, 260, 5131, (1985)
- (25) L. McEvoy, p; Williamson, R.A.Schlegel, Proc. Natl. Acad. Sci. (US), 83,3311, (1986)
- (26) C.E. Creutz, J. Redick, Mol. Biol. of the Cell, 5,324a (1994)
- (27) P. Raynal, H.B. Polard, Biochim. Biophys. Acta, 1197,63, (1994)
- (28) P.F. Devaux, Ann.Rev.Biophys. Biomol. Struct, 21,417, (1992)
- (29) P.D. Smith, S.E. Moss, Trends in Genet., 10,241, (1994)
- (30) M. Perretti et R.J. Flower, Pharmacol. Res., 30,53 (1994)
- (31) G.L. Ellman, Arch. Biochem. Biophys., 82, 70 (1959)

REVENDICATIONS

- 5 1. Procédé pour l'obtention de particules magnétiques formant des ferrofluides substitués par l'ADMS (FFSH), lesdits ferrofluides étant susceptibles d'être couplés directement ou indirectement par liaison covalente à un effecteur, ledit procédé étant caractérisé en ce qu'il comprend les étapes additionnelles suivantes :
- 10 a) les FFSS sont centrifugés avant peptidisation, en milieu basique, du floculat formé lors de l'addition d'ADMS,
- b) les FFSS sont ensuite réduits par addition de dithiothréitol (DTT) à pH basique pour former un mélange FFSH,
- c) l'excès de DTT est éliminé après floculation du FFSH à pH2, les FFSH
15 retenus par un aimant étant ensuite lavés et resuspendus dans un tampon PBS.
2. Procédé pour l'obtention de particules magnétiques formant des ferrofluides, couplées à un effecteur, caractérisé en ce qu'il comprend au moins les étapes suivantes :
- 20 a) l'effecteur est le cas échéant couplé de façon covalente à un réactif bifonctionnel ayant des fonctions capables, après couplage du réactif à l'effecteur, de former une liaison S-S, C-S, C-C ou C-N.
- b) l'effecteur présentant des groupements thiols soit directement soit après couplage par un réactif bifonctionnel comme décrit en a) est incubé en
25 présence de ferrofluides traités par l'ADMS et par le DTT (FFSH) selon un procédé selon la revendication 1, formant ainsi un complexe covalent effecteur-FFSH,
- c) le cas échéant, les groupements des FFSH n'ayant pas réagi dans les étapes précédentes sont masqués par un traitement à saturation par de la
30 Sérum albumine.

3. Procédé selon la revendication 2 caractérisé en ce que le ligand est une Annexine.

4. Procédé selon l'une des revendications 2 ou 3 caractérisé en ce que le réactif bifonctionnel est le SPDP.

5 5. Procédé selon l'une des revendications 2 à 4 caractérisé en ce que le rapport molaire entre les FFSH et l'effecteur lié au réactif bifonctionnel est compris entre 1 et 3.

6. Particules de ferrofluides traitées par l'ADMS et le DTT et réduites par le DTT par un procédé selon la revendication 1.

10 7. Particules de ferrofluides couplées à un effecteur obtenu par un procédé selon l'une des revendications 2 à 5.

8. Particules selon la revendication 7 caractérisées en ce que l'effecteur est une annexine.

15 9. Utilisation des particules selon l'une des revendications 7 ou 8 à la différenciation et/ou à la séparation des composés portant un récepteur de l'effecteur de ceux ne portant pas ledit récepteur.

20 10. Utilisation selon la revendication 9 caractérisée en ce que l'effecteur est une annexine, de préférence l'annexine V, le récepteur est un phospholipide anionique tel la phosphatidylserine (PS), et la différenciation et/ou la séparation concerne les cellules présentant un état anormal, lui-même reflet d'un état pathologique ou physiologique de l'individu porteur desdites cellules capables de se lier aux AnxFF en présence d'ions calcium.

25 11. Utilisation selon l'une des revendications 9 ou 10 caractérisée en ce que les particules de l'AnxFF ont un diamètre compris entre 3 et 30 nm.

12. Utilisation selon l'une des revendications 9 à 11 caractérisée en ce que les cellules sont des érythrocytes et que la différenciation permet :
a) de détecter la présence d'érythrocytes présentant un état physiologique anormal et/ou de les séparer, et/ou
30 b) de contrôler l'état sanitaire d'un concentré globulaire avant transfusion, et/ou

c) d'identifier un éventuel processus pathologique.

13. Méthode pour différencier et/ou séparer des cellules présentant un état physiologique ou pathologique anormal et se manifestant par la présence d'un récepteur à l'annexine, notamment la phosphatidyl sérine (PS) à leur surface, caractérisé en ce qu'elle comprend :

- a) une complexation des particules de ferrofluides à une annexine par un procédé selon l'une des revendications 2 à 6 aux cellules en présence d'ions calcium,
- b) la séparation des cellules couplées aux Anx FF des cellules non couplées par un champ magnétique,
- c) le comptage des cellules ayant lié les Anx FF,
- d) l'évaluation de la proportion des cellules saines étant réalisée par la mesure du rapport entre les cellules n'ayant pas réagi avec l'Anx FF au nombre total des cellules.

14. Méthode selon la revendication 13 caractérisée en ce que les cellules sont des érythrocytes.

15. Méthode selon la revendication 13 ou 14 caractérisée en ce que les ions calcium sont apportés par le CaCl_2 à une concentration comprise entre 0,5 et 5 mM.

16. Dispositif permettant la différenciation et/ou la séparation des composés portant un récepteur du ligand couplé aux FFSH caractérisé en ce qu'il comprend au moins :

- a) un électroaimant,
- b) une pompe,
- c) un moyen d'amener l'échantillon,
- d) un moyen d'amener le tampon contenant les ions calcium,
- e) un moyen d'amener les tampons de lavage,
- f) des valves permettant de contrôler les passages de fluides.

1 / 5

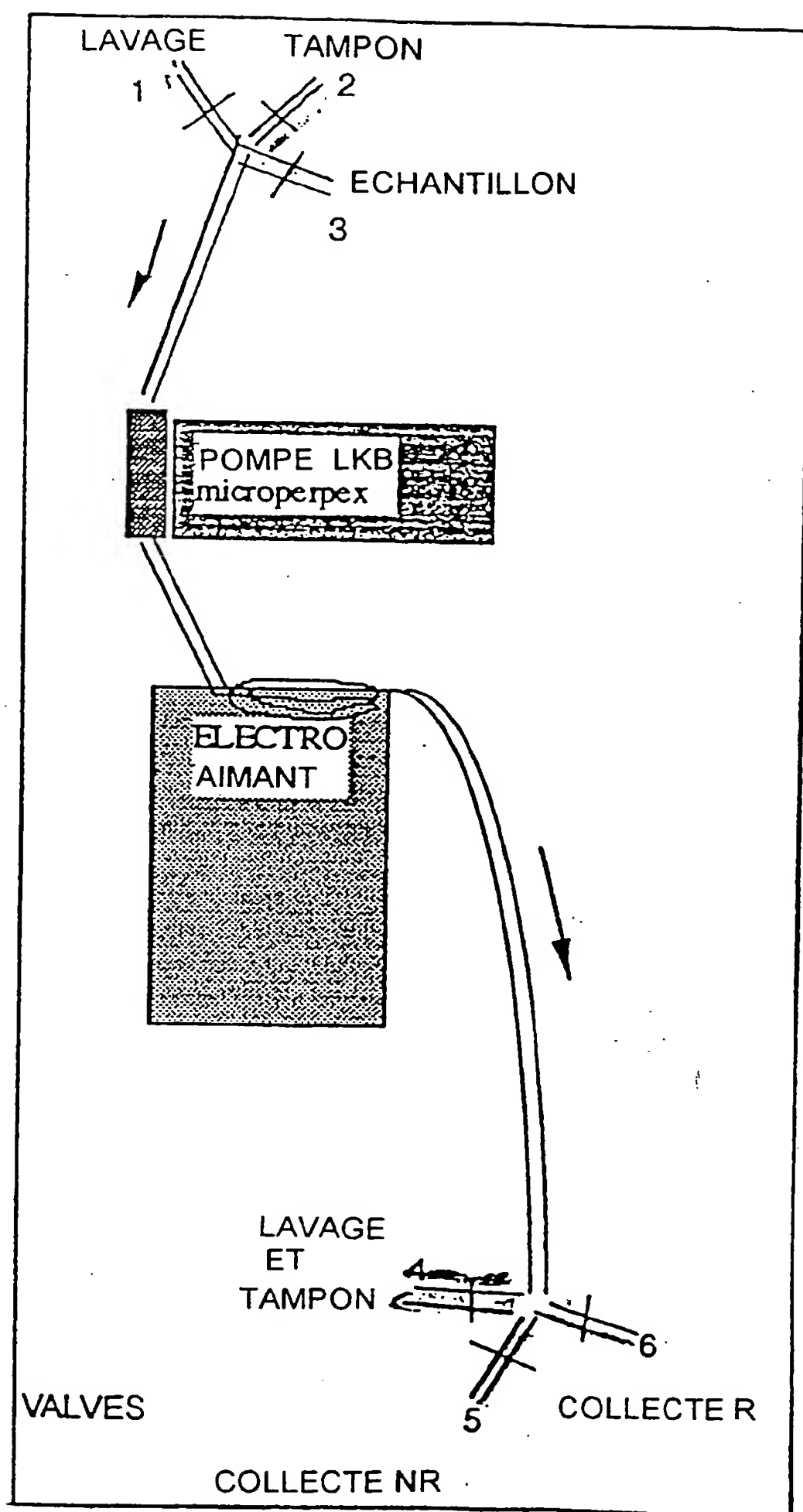


FIGURE 1
FEUILLE DE REMPLACEMENT (RÈGLE 26)

2 / 5

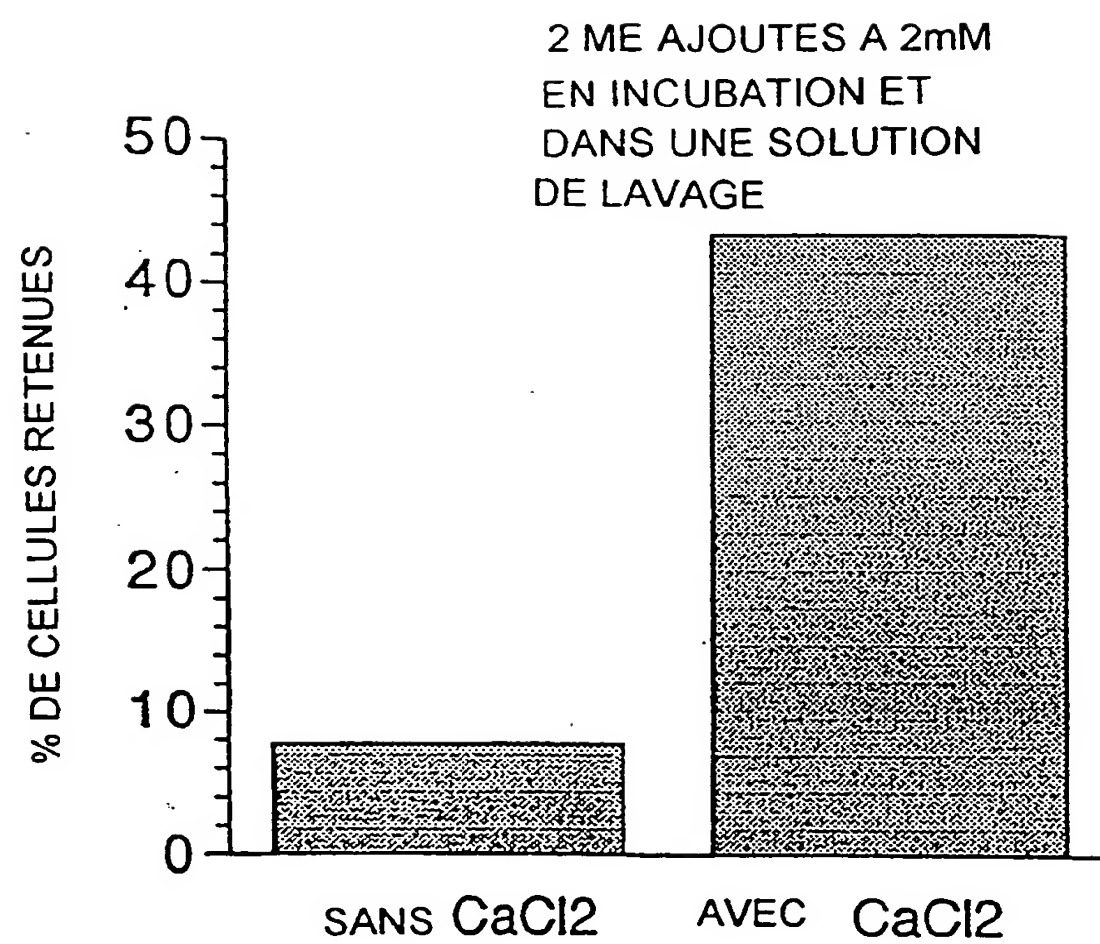


FIGURE 2

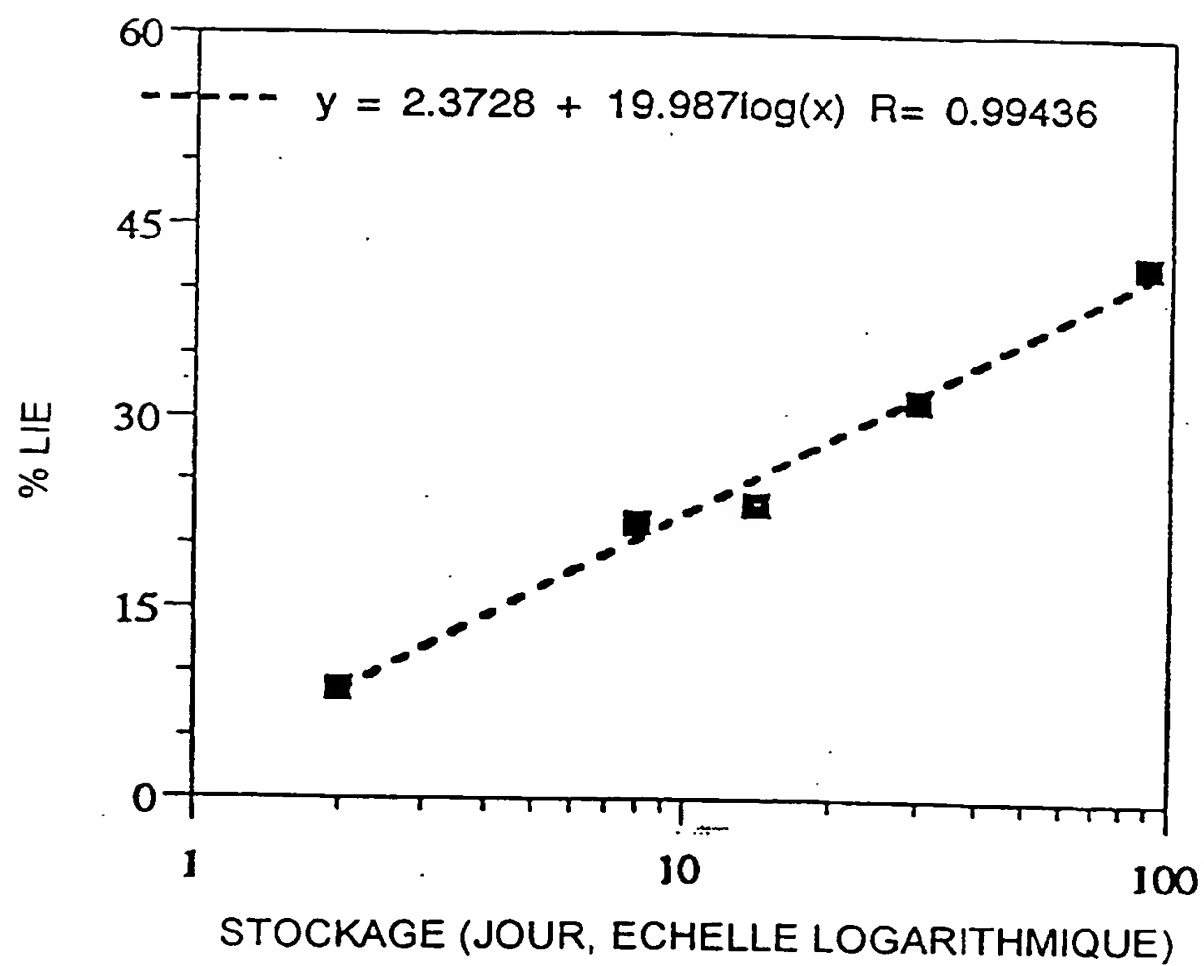


FIGURE 3

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

4 / 5

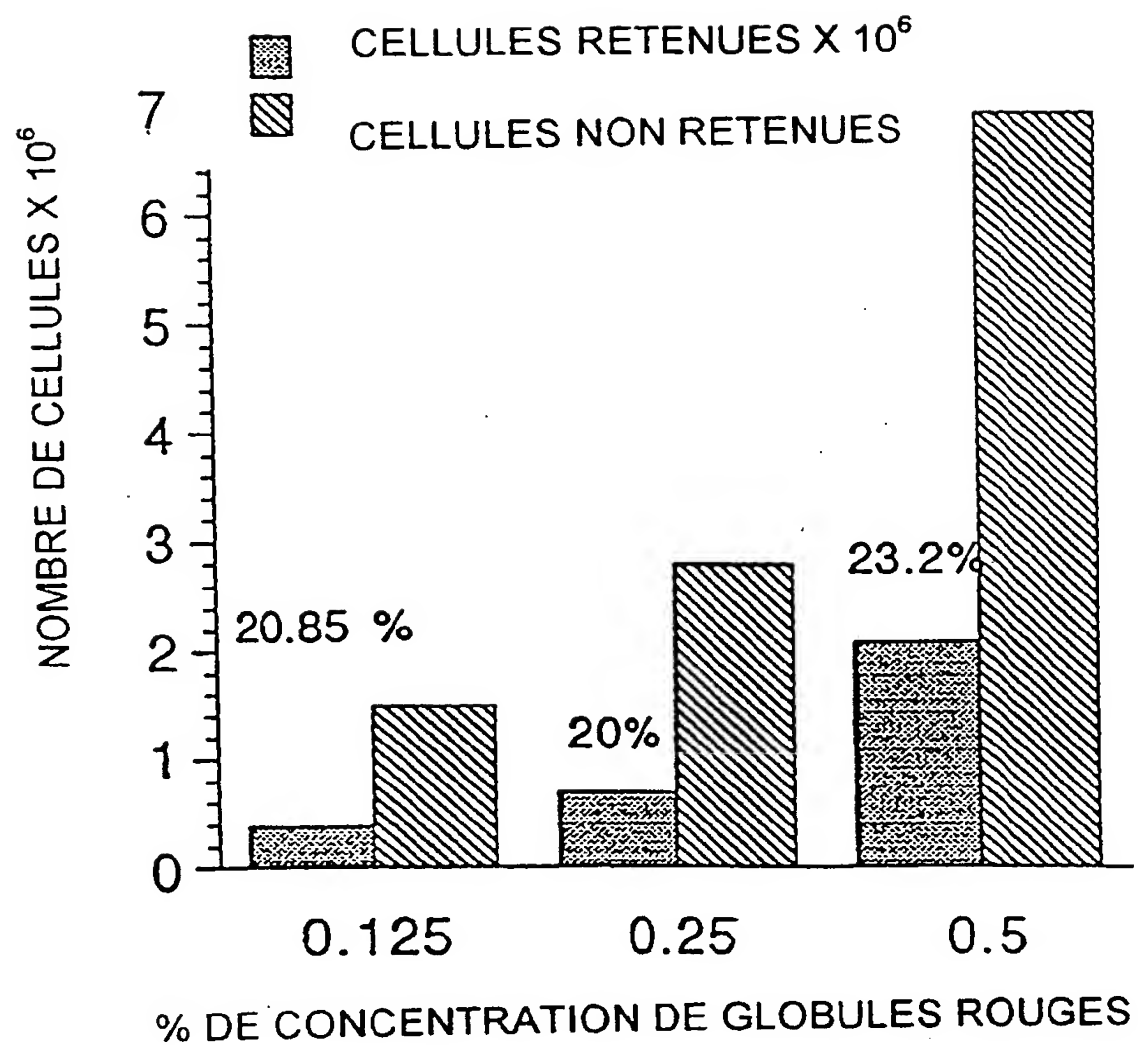


FIGURE 4

5/5

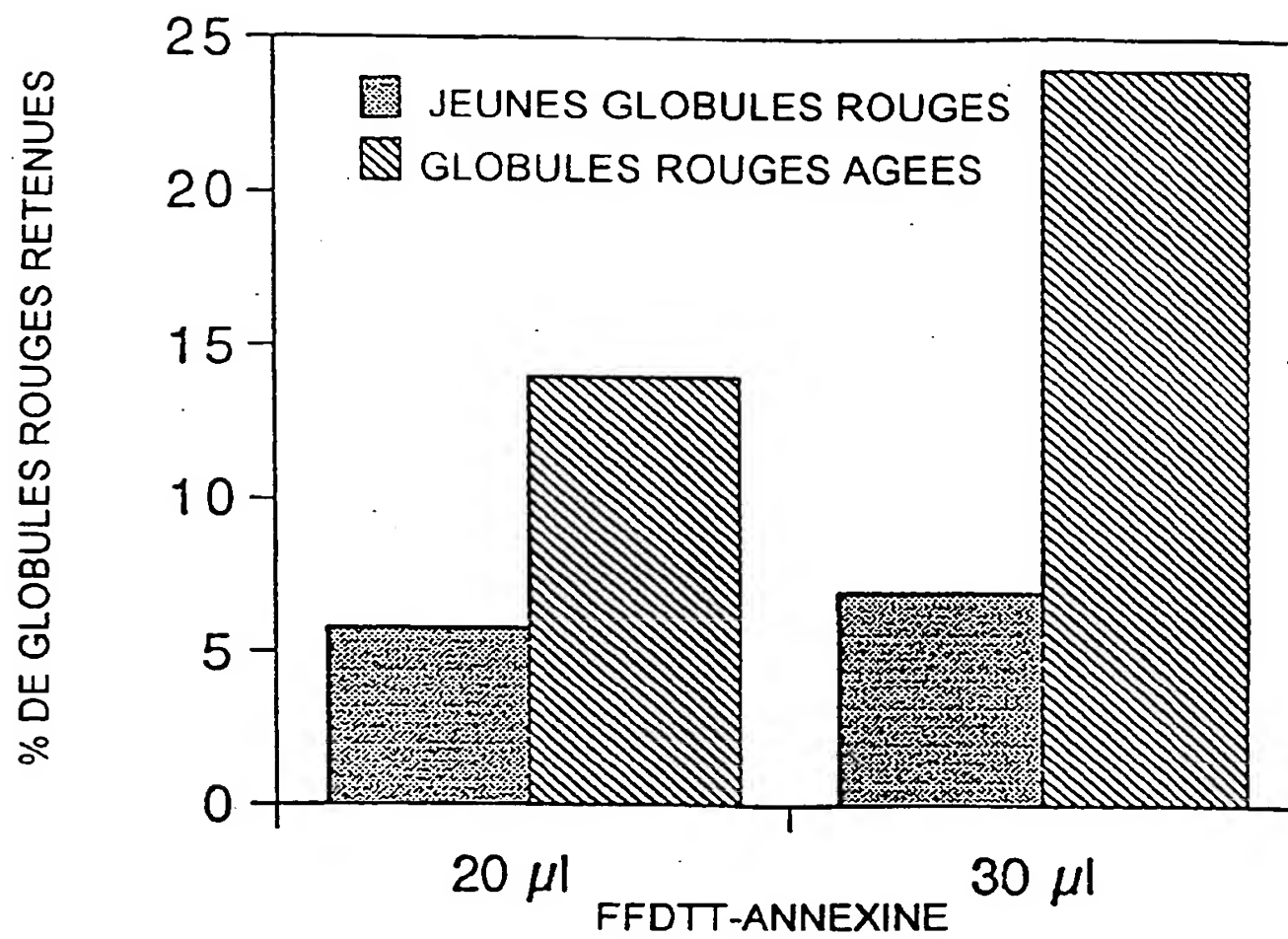


FIGURE 5

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/FR 96/00964

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 G01N33/543 G01N33/86 G01N33/68 H01F1/44

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 G01N H01F

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	FR,A,2 662 539 (CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIC) 29 November 1991 cited in the application see the whole document ---	1-16
Y	DE,A,40 40 817 (BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL) 4 July 1991 see the whole document --- -/--	1-16

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

27 August 1996

Date of mailing of the international search report

19.09.96

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Van Bohemen, C

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 96/00964

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
T	<p>COMPTES RENDUES DE L'ACADEMIE DES SCIENCES SERIE III SCIENCES DE LA VIE, vol. 318, no. 11, 1 November 1995, PARIS F, pages 1141-1146, XP000566338 C. SESTIER ET AL.: "Use of annexin V-ferrofluid to enumerate erythrocytes damaged in various pathologies or during storage in vitro." see the whole document -----</p>	1-16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 96/00964

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
FR-A-2662539	29-11-91	DE-A- 4116093	28-11-91
		GB-A- 2244987	18-12-91
		JP-A- 4261002	17-09-92

DE-A-4040817	04-07-91	AU-B- 642202	14-10-93
		AU-B- 7071191	24-07-91
		CA-A- 2070647	28-06-91
		WO-A- 9109628	11-07-91
		EP-A- 0509026	21-10-92
		HU-B- 209650	28-09-94

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No
PCT/FR 96/00964

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 6 G01N33/543 G01N33/86 G01N33/68 H01F1/44

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 G01N H01F

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	FR,A,2 662 539 (CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIC) 29 Novembre 1991 cité dans la demande voir le document en entier ---	1-16
Y	DE,A,40 40 817 (BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL) 4 Juillet 1991 voir le document en entier ---	1-16
	-/--	



Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents



Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- "&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

27 Août 1996

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

19.09.96

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+ 31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Van Bohemen, C

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No
Pct/FR 96/00964

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
T	<p>COMPTES RENDUES DE L'ACADEMIE DES SCIENCES SERIE III SCIENCES DE LA VIE, vol. 318, no. 11, 1 Novembre 1995, PARIS F, pages 1141-1146, XP000566338 C. SESTIER ET AL.: "Use of annexin V-ferrofluid to enumerate erythrocytes damaged in various pathologies or during storage in vitro." voir le document en entier -----</p>	1-16

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs membres de familles de brevets

Demande internationale No

FR 96/00964

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
FR-A-2662539	29-11-91	DE-A- 4116093	28-11-91
		GB-A- 2244987	18-12-91
		JP-A- 4261002	17-09-92

DE-A-4040817	04-07-91	AU-B- 642202	14-10-93
		AU-B- 7071191	24-07-91
		CA-A- 2070647	28-06-91
		WO-A- 9109628	11-07-91
		EP-A- 0509026	21-10-92
		HU-B- 209650	28-09-94

This Page Blank (uspto)